

PEPTIDE HAVING FUNCTION TO SUPPRESS TRANSCRIPTION OF GENE

Patent number: JP2001269176
Publication date: 2001-10-02
Inventor: TAKAGI MASARU; SHINSHI HIDEAKI; OTA MASARU
Applicant: NATL INST OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE & TECHNOLOGY METI
Classification:
- international: C12N15/09; C07K14/415; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10
- european:
Application number: JP20000087536 20000327
Priority number(s):

Abstract of JP2001269176

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a peptide derived from a higher plant having a function to bond to a DNA and suppress the transcription of gene, a gene coding for the peptide, a recombinant vector containing the gene and a transformant containing the recombinant vector.

SOLUTION: The peptide derived from a higher plant has a motif composed of aspartic acid-leucine-asparagine and a function to suppress the transcription of gene.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-269176
(P2001-269176A)

(43) 公開日 平成13年10月2日 (2001.10.2)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 14/415	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/415		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	4 H 0 4 5
1/21		C 1 2 P 21/02	C
審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 19 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-87536(P2000-87536)

(22) 出願日 平成12年3月27日 (2000.3.27)

(71) 出願人 301000011

経済産業省産業技術総合研究所長
東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(72) 発明者 高木 優

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 進士 秀明

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 太田 賢

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド

(57) 【要約】

【課題】 DNAに結合し遺伝子の転写を抑制する機能を有する高等植物由来のペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体を提供する。

【解決手段】 アスパラギン酸-ロイシン-アスパラギンからなるモチーフを有し、遺伝子の転写を抑制する機能を有する高等植物由来のペプチド。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アスパラギン酸-ロイシン-アスパラギンからなるモチーフを有し、遺伝子の転写を抑制する機能を有する高等植物由来のペプチド。

【請求項2】 (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】 (a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする請求項1に記載のペプチド。

【請求項4】 請求項2又は3に記載のペプチドをコードする遺伝子。

【請求項5】 請求項4に記載の遺伝子を含有する組み換えベクター。

【請求項6】 請求項5に記載の組み換えベクターを含む形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体に関する。

【0002】

【従来の技術】植物ホルモン、エチレンに応答するシス制御エレメントに結合するタンパク質因子ERF (Ethylene Responsive Element binding Factor) は、ERFドメインと名付けたDNA結合ドメインを有する植物特有の転写因子である。最近の研究から、ERFタンパク質をコードする遺伝子は、マルチジンファミリーを構成していることが明らかになっている。これまでに、タバコ、シロイヌナズナ植物からERFドメインを有するタンパク質因子をコードするcDNAが明らかにされているが、本発明者らはさらに、タバコ、イネ、シロイヌナズナのcDNAについて機能解析を行い、植物細胞内でリプレッサーとして機能するドメインを明らかにし、本発明を完成した。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】すなわち、本発明はDNAに結合し遺伝子の転写を抑制する機能を有する高等植物由来のペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、タバコ、イネ、シロイヌナズナのcDNAについて機能解析を行った結果、ERF因子のカルボキシ末端領域のアスパラ

ギン酸-ロイシン-アスパラギン(DLN)からなるモチーフを有する領域が、遺伝子の転写を抑制する機能を有することを発見し、本発明を完成した。このようなDLNモチーフを有し遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチドとしては、例えばタバコ由来のERF3に含まれるペプチド(配列番号1)；シロイヌナズナ由来のAtERF3、AtERF4、AtERF7及びAtERF8に含まれるペプチド；イネ由来のOsERF3に含まれるペプチドが挙げられる。

【0005】

【発明の実施の形態】機能解析の方法は、それぞれのERF因子をコードしているcDNAから、タンパク質コード領域を切り出し、これを酵母のGAL4転写因子のDNA結合ドメインをコードしている領域と結合し、さらに植物細胞で機能するカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流につないでエフェクタープラスミドを構築する。これをGAL4タンパク質結合部位をプロモーター領域に結合した、ルシフェラーゼ遺伝子からなるリポーター遺伝子と同時に、タバコ培養細胞にエレクトロポーション法により導入し、リポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子の活性を測定することによって調べた。

【0006】つぎに、リプレッサー因子に存在するリプレッサー機能を有する領域であるリプレッサードメインを同定するために、各遺伝子のコード領域を削除する方法であるディリーション解析法を用いて、ERF因子のどの領域にリプレッサードメインが存在するのかを調べた。

【0007】

【実施例】ERF3遺伝子の単離

タバコcDNAライブラリーから、植物ホルモンエチレン応答性シスエレメントとして機能することが明らかにされている塩基配列AGCGGCC(参考文献Plant Cell, 1995 vol. 7, p173-182)と結合能を持つタンパク質をコードするcDNAをAGCGGCCを含むDNA断片をプローブとしてDNA-タンパク質アフィニティー法を用いて単離した。

【0008】(cDNAライブラリーの作成法)タバコ植物体から葉を採取し、液体窒素中でミキサーを用いて粉状に粉砕する。この粉砕した葉粉末10gに対し20mLのRNA抽出バッファー(8M塩酸グアニジン、20mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、20mM 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、50mMメルカプトエタノール)と8mLのTE溶液(10mM Tris-Gl pH8.0, 1mM EDTA)で飽和したフェノールと2mLのクロロホルムを加えよく攪拌し、遠心(10000g)して上清を回収する。上清に対して0.2倍容量の1M酢酸と0.7倍容量のエタノールを加え-20℃で静置した後、遠心(10000g)する。沈殿を2mLのTE溶液に溶解し、500mLの10M塩化リチウム溶液を加え、0℃で2時間静置し、遠心する。沈殿を70%のアルコール

で洗浄した後、風乾し、全RNA標品を得た。この全RNAをプロメガ社製Poly A Tract System 1000 を用いて全RNAからmRNAのみを精製した。このmRNAを鋳型としてファルマシア社製cDNAダイレクションクローニングキットを用いて二本鎖cDNAを合成。これらをファルマシア社のプロトコールに従ってラムダgt11発現ベクターのEcoRI-NotI制限酵素サイトに組み込んだのち、ラムダパッケージングキット（ファルマシア社）を用いてライブラリーを完成させた。

【0009】（スクリーニング法）作成したタバコcDNAライブラリーを組み込んだラムダファージを約4万個のプラークが得られる容量を、予め0.5ccmLの10mMの硫酸マグネシウム溶液で懸濁しておいた大腸菌1090株に懸濁して感染させ、選択するための薬剤である50mg/Lのアンピシリン酸ナトリウムLB寒天培地（1Lに対して10gトリプトン、10g塩化ナトリウム、5gイーストエキストラ、クト、15g寒天）に展開し、37℃で培養する。プラークが約2mmになった時点で1mMのイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）溶液に浸したニトロセルロース膜をプラークの生育している寒天培地にのせ、更に37度で4時間培養する。プレートからフィルターを剥がしてファージを写し取り、5%（V/V）のスキムミルクを含む結合バッファー（25mM HEPES[2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジリル]エタンスルホン酸] pH7.5, 40 mM KCl, 5%v/v glycerol, 20ug/ml poly(dA-dT) (dA-dT), 0.5 mM EDTA)に4℃で2時間浸した後、さらに0.5%（V/V）のスキムミルクを含む結合バッファーに4℃で1時間浸す。バッファーを全て除いた後、32Pラジオアイソトープで末端ラベルした以下の配列からなる二本鎖DNA（配列番号3）AGATCTCATAAGAGCGGCCACTAAATAAGACCGATCAAAATAGAGCGGCCATGを添加したバッファー（フィルター一枚につき3mL）にフィルターを15℃で1時間浸した後、DNAの入っていない同じバッファーで3回洗い、X線フィルムに感光させ、プローブのDNAが結合したファージを元の寒天プレートから単離した。単離したファージを大腸菌に感染させ、上記のスクリーニングをさらに2回繰り返して、単一のプラークに単離した後、ファージよりDNAを抽出し、cDNA領域を制限酵素EcoRIとNotIを用いて切り出した。このDNA断片をプラスミドpT7D3（ファルマシア社）の制限酵素EcoRI-NotI部位に組み込み、プラスミド塩基配列の解析をおこない、タバコERF3のcDNAの全塩基配列を得た（配列番号1）。ERF3のcDNAの全長配列を持つプラスミドをpERF3と名付けた。

【0010】（ERF3全長を含むエフェクタープラスミドpGAL4DB-ERF3の構築：図1参照）クローンテック社製（Clontech社、USA）のプラスミドpBI221を制限酵素XhoIとSstIで切断し、T4ポリメラーゼで平滑末端処理した後、アガロースゲル電気泳動でGUS遺伝子を除き、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター（以下CaMV35S）

とノバリン合成酵素遺伝子の転写終止領域（Nosターミネーター、以下Nos-ter）を含む35S-Nosプラスミド断片DNAを得た。クローンテック社製のpAS2-1ベクターを制限酵素HindIIIで消化し、酵母 GAL4タンパク質のDNA 結合領域（1-147 アミノ酸残基）をコードする 748 bp のDNA 断片（以下GAL4DBD）をアガロースゲル電気泳動によって単離した後、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理をした。このGAL4DBDを含むDNA断片を、先ほどの35S-NosのDNAの35SプロモーターとNosターミネーター間の平滑末端にした部位に挿入し、35Sプロモーターに対して酵母 GAL4 タンパク質のDNA 結合領域の ORF が順方向に並んでいるものを選択して35S-GAL4DBD ベクター（図1では、p35S-GALDBと記載）を構築した。

【0011】（ERF3全長およびディリーションしたコード領域の作成とp35S-GALDBへのクローニング）ERF3のcDNAプラスミドpERF3とGAL4DBDと読み枠（フレーム）が一致するように設計した5'末アッパープライマーprimer1（配列番号4：ERF3塩基配列1-19に結合）GATGGGTGCAAAAATAAGGと制限酵素SalI部位を持つ3'末ローワープライマーprimer2（配列番号5：ERF3塩基配列661-678に結合）CCAAATAACATTATCGGTGCTGCTCAAAATTCATAGGTGを用いてERF3全タンパク質コード領域（配列番号1：ERF3塩基配列1-678：アミノ酸配列1-225）をPCR法によって増幅し、DNA断片を得た。PCR反応の条件は、変性反応94℃ 1分、アニール反応47℃ 2分、伸長反応74℃ 1分を1サイクルとして25サイクルおこなった。以下全てのPCR反応は同じ条件でおこなった。得たDNA断片を制限酵素SalIで消化した後、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このERF3をコードするDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-ERF3を構築した。上記したプラスミドpBI221からpGAL4DB-ERF3を構築する手順を図1に示した。

【0012】（ERF3アミノ酸1/25を含むERF3ディリーションエフェクタープラスミドpGAL4-1/25ERF3の構築）pERF3プラスミドとGAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5'末アッパープライマーprimer3（配列番号6：結合部位ERF3塩基配列1-19）GATGGCTGTCAAAAATAAGGと制限酵素SalI部位を持つ3'末ローワープライマーprimer4（配列番号7：結合部位ERF3塩基配列69-75）CTTCCTTACACCGTCTGACTTAAACCTCCを用いてERF3のアミノ酸配列1/25コード領域に該当する塩基配列1-75の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このERF3のアミノ酸配列1/25にをコードするDNA領域1-75のDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-1/25ERF3を構築した。

【0013】（ERF3アミノ酸26/82を含むERF3ディリー

ションエフェクタープラスミドpGAL4-26/82ERF3の構築) pERF3プラスミドとGAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5末アッパープライマー-primer5 (配列番号8: 結合部位ERF3塩基配列75-99) TCACTACAGAGGTGAAGGAAGAGGと制限酵素SalI部位を持つ3末ローワープライマー-primer6 (配列番号9: 結合部位ERF3塩基配列239-246) CTCTGATTCTCGTCGACTTAAGGGAAGTTAGを用いてERF3のアミノ酸配列26/82コード領域に該当する塩基配列75-246の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-26/82ERF3を構築した。

【0014】(ERF3アミノ酸83/225を含むERF3ディリーションエフェクタープラスミドpGAL4-83/225ERF3の構築) pERF3プラスミドとGAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5末アッパープライマー-primer7 (配列番号10: 結合部位ERF3塩基配列249-269) TTCACCGACGGAGAATCAGAGと制限酵素SalI部位を持つ3末ローワープライマー-primer2 (配列番号5: 結合部位ERF3塩基配列661-678) CCAAATAACATTATCGGTGCGACTCAAAATTCCATAGGTGを用いてERF3のアミノ酸配列83/225コード領域に該当する塩基配列249-678の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-83/225ERF3を構築した。

【0015】(ERF3アミノ酸83/123を含むERF3ディリーションエフェクタープラスミドpGAL4-83/123ERF3の構築) pERF3プラスミドとGAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5末アッパープライマー-primer7 (配列番号11: 結合部位ERF3塩基配列246-269) TTCACCGACGGAGAATCAGAGと制限酵素SalI部位を持つ3末ローワープライマー-primer8 (配列番号12: 結合部位ERF3塩基配列356-369) GCCATCTGCAGCGTCGACTCAAAGACGGCGCGを用いてERF3のアミノ酸配列83/123コード領域に該当する塩基配列246-369の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-83/123ERF3を構築した。

【0016】(ERF3アミノ酸124/189を含むERF3ディリーションエフェクタープラスミドpGAL4-124/189ERF3の構築) pERF3プラスミドとGAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5末アッパープライマー-primer9 (配列番号13: 結合部位ERF3塩基配列369-391) CTCGGTGTGCTGCAGATGGCCGGTGと制限酵素SalI部位を

持つ3末ローワープライマー-primer10 (配列番号: 14 結合部位ERF3塩基配列559-567) TCCGACACAGTAGGGTCGACTCAGGCGTTAACを用いてERF3のアミノ酸配列83/123コード領域に該当する塩基配列369-567の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-124-189ERF3を構築した。

【0017】(ERF3アミノ酸191/225を含むERF3ディリーションエフェクタープラスミドpGAL4-191/225ERF3の構築) pERF3プラスミドとGAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5末アッパープライマー-primer11 (配列番号15: 結合部位ERF3塩基配列569-593) AGTGGGTCCTACTGTGTCGGACTCと制限酵素SalI部位を持つ3末ローワープライマー-primer2 (配列番号5: 結合部位ERF3塩基配列661-678) CCAAATAACATTATCGGTGCGACTCAAAATTCATAGGTGを用いてERF3のアミノ酸配列191/225コード領域に該当する塩基配列569-678の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-191/225ERF3を構築した。

【0018】(ERF3アミノ酸204/225を含むERF3ディリーションエフェクタープラスミドpGAL4-204/225ERF3の構築) pERF3プラスミドとGAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5末アッパープライマー-primer12 (配列番号16: 結合部位ERF3塩基配列609-627) AGAGAACCAATATGATGGGと制限酵素SalI部位を持つ3末ローワープライマー-primer2 (配列番号5: 結合部位ERF3塩基配列661-678) CCAAATAACATTATCGGTGCGACTCAAAATTCCATAGGTGを用いてERF3のアミノ酸配列204/225コード領域に該当する塩基配列609-678の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素SalIで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このDNA断片を、制限酵素SmaIとSalIで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-204/225ERF3を構築した。

【0019】レポーター遺伝子の構築 (図2及び図3参照)

プラスミドpUC18を制限酵素EcoRIとSstIで消化する。pBI221 (クローンテック社)を制限酵素EcoRIとSstIで消化し、Nos-ter (nopaline synthase terminator) 領域を含む270bpのDNA断片を挿入するアガロースゲル電気泳動によって単離する。得られた断片を制限酵素EcoRIとSstIで消化しておいたプラスミドpUC18のEcoRI-SstI部位に挿入する。カリフラワーモザイクウイルス35SプロモーターTATAボックスを含む相補鎖のDNA1 (配列番

号17)AGCTTAGATCTGCAAGACCCCTCTCTATATAAGGAAGTTCAT
TTCATTTGGAGAGGACACGCTG及びDNA2(配列番号18)
GATCCAGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAAGTTCCTTATATAGAGGAAG
GGTCTTGCAGATCTAを合成する。合成したDNAを90℃2分加
熱した後、60℃で1時間加熱し、その後室温(25
℃)で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成さ
せる。Nos-terを持つpUC18プラスミドを制限酵素HindI
IIとBamHIで消化する。合成した2本鎖DNAをpUC18の
HindIII-BamHI部位に挿入し、TATA-boxとNos-terを含む
プラスミドを構築する。上記した手順は、図2に示し
た。

【0020】このプラスミドを制限酵素SstIで消化し、
T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理をおこなう。ホ
タル・ルシフェラーゼ遺伝子(LUC)をもつプラスミドベ
クターPGV-CS2(東洋インキ社製)を制限酵素XbaIと
NcoIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理
をおこなった後、アガロースゲル電気泳動によって、ル
シフェラーゼ遺伝子を含む1.65 kbのDNA断片を単離
精製した。このDNA断片を上記のTATAボックスとNosター
ミネーターを含むプラスミドに挿入しTATA-LUCリポー
ター遺伝子を構築した。酵母のGAL4タンパク質のDNA
結合配列を5コピー持つプラスミドpG5CAT(Clontech
社製)を制限酵素SmaIとXbaIで消化し、T4 DNAポリ
メラーゼで平滑末端処理をおこなった後、5コピーの
GAL4タンパク質のDNA結合配列を含むDNA断片をアガ
ロースゲル電気泳動で精製した。TATA-LUCベクターを
制限酵素BglIIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末
端処理をおこなう。この部位に平滑末端化した5コピー
のGAL4タンパク質のDNA結合配列を含むDNA断片を
挿入し、得られたプラスミドのうちGAL4タンパク質の
DNA結合配列が順方向に向いているものを選抜し、リ
ポーター遺伝子GAL4-LUCを構築した。(図3参照)

【0021】(リファレンス遺伝子の構築)ウミシイタ
ケ由来のルシフェラーゼ遺伝子をもつプロメガ社製カセ
ットベクターpRL-nullを制限酵素NheIとXbaI制限酵
素で切断し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端処理を
行った後、アガロースゲル電気泳動でウミシイタケ・
ルシフェラーゼ遺伝子を含む948 bpのDNA断片を精
製する。このDNA断片をエフェクタープラスミドの構
築の際に用いたGUS遺伝子を除いたpBI221ベクターのGUS
遺伝子があった領域に挿入する。得られたプラスミド
のうち、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子が順方
向に向いているものを選抜する(pPTRLの構築)。

【0022】(レポーター遺伝子の活性測定法)タバコ
培養細胞プロトプラストにレポーター遺伝子とエフェク
タープラスミドを電圧ポレーション法を用いて導
入し、エフェクターの効果を確認するレポーター遺伝子の活性を
測定することによって調べた。

【0023】(プロトプラストの調製法)100 mLのMS
培地(ムラシゲ・スコーグ培地用混合塩類、日本製薬

社製、3%シヨ糖、0.2 g/L KH₂PO₄、0.2 g/L m-inosito
l、2 mg/L glycine、1 mg/L 塩酸チアミン、0.2 mg/L
2, 4-D、pHを5.8に調節する)に7日間培養したタ
バコ培養細胞BY-2の前培養液3 mLを加えて26℃で
3日間暗所で培養した細胞を金属製のメッシュ(目の開
きが125 μm、東京スクリーン社製)濾過回収し、0.4 M
マニトールを含むMS培地で細胞を洗浄する。洗浄し
た細胞を25 mLの0.4 Mマニトールを含むMS培地
に懸濁して10分間室温で放置3,000 rpmで1分間遠心
して細胞を回収する。この細胞を20 mLの1%セルラ
ーゼ(オノヅカRS、)と0.1%ペクトリアーゼY-23
(セイシン社製)を含むMS培地に細胞を再懸濁して、
26℃で90分間暗所で60 rpmで回転振とうしながら細
胞壁を消化する。その後、1,000 rpmで5分間遠心して
プロトプラストを回収する。

【0024】(電圧ポレーションによる遺伝子導
入)上記で得たプロトプラストを濃度が2.5 × 10⁶ 細
胞/mLになるように電圧ポレーション緩衝液
(5 mM MES pH5.8, 70 mM KCl, 0.3 M マニトール)に
再懸濁する。電圧ポレーション用キュベット
(ジーンパルサーキュベット0.4 cm electrode、バイオ
ラッド社製)に構築したpGAL4-LUCレポーター遺伝子と
エフェクタープラスミドとしてpGALDB-ERF3あるいはそ
のデレクションシリーズ(pGALDB-1/25ERF3、pGALDB-204
-225ERF3)のDNAを各10 μgとリファレンス遺伝子プ
ラスミド1 μgを100 μLの2X電圧ポレーション緩
衝液(10 mM MES pH5.8, 140 mM KCl, 0.6 M マニト
ール)を加えて、滅菌水で全量を200 μLにする。キュベ
ットに600 μLのプロトプラスト懸濁液を入れて、エ
レクトロポレーター(Genepulser II Electroporation Sy
stem、バイオラッド社製)を用いて600 V、25 mFの条件
でDNAを導入する。導入後、キュベットからプロトプ
ラストを1,000 rpmで5分間遠心して回収し、5 mLの
0.4 M マニトールを含むMS培地にプロトプラストを
再懸濁して、26℃で6時間暗所で静置した後、レポー
ター遺伝子の活性を測定した。

【0025】(ルシフェラーゼ活性測定)6時間静置し
たプロトプラスト懸濁液を1 mL採取して、2,000 rpm
で3分間遠心してプロトプラストを回収した後、Dual-
Luciferase™ Reporter Assay System (Promega 社製)
に添付されているPassive Lysis Buffer 50 μLに懸
濁する。プロトプラストを破砕した後、遠心して上清を
回収する。この細胞抽出液を5 μL用いてDual-Lucifer
ase™ Reporter Assay System (Promega 社製)とルミネ
ッセンスリーダー(BLR-201、アロカ社製)を用いてル
シフェラーゼ活性測定を行なった。ホタル・ルシフェラ
ーゼおよびウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の測定を
測定キットの説明書に従って10秒間の発光を積分モー
ドでカウントした。リファレンス遺伝子の活性値をレ
ポーター遺伝子の活性値で割り、その相対値であるRela

tive luciferase activityを測定値として求めた。エフェクターを入れない場合の相対値を100として、エフェクタープラスミドを同時に細胞に導入したときにリポーター遺伝子の活性値の変動によってエフェクターの効果进行调查した。すなわち、pGAL4-LUCレポーター遺伝子とpGALDB-ERF3エフェクタープラスミドを導入したときのリポーターの活性値が50となることから、pGALDB-ERF3は、レポーター遺伝子の活性を抑制する効果（リプレッサー機能）があることを示している。以下、リポーターの活性値を測定して、リポーターの相対活性値が100以下になる場合に、導入したエフェクターにはリプレッサー機能が存在するので、どのエフェクターがリプレッサーとして機能するのかをリポーターの活性を測定することによって調べた。

【0026】（リプレッサードメインの同定）タバコERF3の遺伝子の転写制御に関わる機能を解析するため、リポーター遺伝子pGAL4-LUCとpGALDB-ERF3をタバコ培養細胞より調整したプロトプラストにエレクトロポレーション法によって導入し、リポーター遺伝子の活性を調べた。その結果、pGALDB-ERF3エフェクターは、リポーター遺伝子の活性をエフェクターを導入しないリポーター遺伝子の場合（コントロール）に比べ50%減少させた。このことは、ERF3が転写を抑制するリプレッサーとして機能していることを示している。ERF3のリプレッサードメインを特定するために、ERF3遺伝子のタンパク質コード領域をそれぞれの領域にディリーションしたDNA断片もつエフェクタープラスミド、pGALDB-1/25ERF3、pGALDB-26/82ERF3、およびpGALDB-83/225ERF3をもちいて、どの領域がリポーター遺伝子の活性を抑制する機能をもつリプレッサードメインであるかを調べた。結果を図4Bに示した。

【0027】上記の個々のエフェクタープラスミドをリポーター遺伝子と共にタバコ培養細胞に導入し、リポーター遺伝子の活性を測定した結果、pGALDB-83/225ERF3エフェクターは、pGALDB-ERF3を導入した場合と同様に、レポーター遺伝子の活性をコントロールに比べ、約50%抑えるリプレッサー機能があることが示された。しかし、pGALDB-1/25ERF3およびpGALDB-26/82ERF3にはリポーターの活性を抑制する効果はみられなかった。このことは、ERF3のアミノ酸配列83/225に相当する領域にリプレッサー機能が存在することを示している。その他の領域である1/25あるいは26/82の領域にはリプレッサー機能がないことがわかった（図4B）。

【0028】次に83/225アミノ酸配列のどの領域にリプレッサー機能が存在するのか特定するために、上記に示した83/225領域をさらにディリーションしたDNAをもつエフェクタープラスミド、pGALDB-83/123ERF3、pGALDB-124/189ERF3あるいはpGALDB-191/225ERF3をリポーター遺伝子pGAL4-LUCとともにプロトプラストに導入してリポーター遺伝子の活性を測定した。その結果、pGALDB-1

91/225ERF3を導入した場合、リポーター遺伝子の活性が、約50%減少した。しかし、その他のエフェクターであるpGALDB-83/123ERF3あるいはpGALDB-124/189ERF3を導入した場合リポーターの活性は減少しなかった。この結果から、ERF3のリプレッサー機能を持つ領域（リプレッションドメイン）は、ERF3のアミノ酸配列、191/225に存在することが示された。さらに、この191/225の領域をディリーションした領域をもつエフェクタープラスミドpGALDB-204/225ERF3も同様にリポーター遺伝子の活性を抑制する効果を持つことから、ERF3のアミノ酸配列領域204/225の22アミノ酸からなる領域がERF3のリプレッサードメインであることを明らかにした（図4B）。この22アミノ酸からなる領域のアミノ酸配列を、配列番号2に示した。

【0029】これらのリプレッサードメインのアミノ酸配列中のどのアミノ酸がリプレッサー機能に関与しているかを調べるため、リプレッサー機能を持つpGALDB-191/225ERF3エフェクタープラスミドとプライマー5' M1（配列番号19：ERF3塩基配列571-589に結合）CGGACACAGTAGGACCCACと3' M1（配列番号20：ERF3塩基配列591-610に結合）GCTCGTCTCTGCAGTGGAGをもちいてPCR反応をおこない、配列番号1に示すERF3のアミノ酸番号197番のアスパラギン酸コドンのアラニンのコドンに置換したDNAをもつエフェクタープラスミドpM1-191/225ERF3を構築した。

【0030】同様にプライマー5' M2（配列番号21：ERF3塩基配列639-620に結合）CAATTCCTCTTTCCCATCAと3' M2（配列番号22：ERF3塩基配列641-660に結合）CTCTTGCTCTTAACCTTGCTをもちいてPCR反応をおこない、配列番号1に示すERF3のアミノ酸番号214番と216番のアスパラギン酸コドンのアラニンのコドンに置換したDNAをもつエフェクタープラスミドpM2-191/225ERF3を構築した。また、プライマー5' M3（配列番号23：ERF3塩基配列651-670に結合）CCATAGGTGGAGCAAGGTTAと3' M3（配列番号24：ERF3塩基配列672-680に結合）CATTTTGATGATGACGATAAをもちいてPCR反応をおこない、配列番号1に示すERF3のアミノ酸番号224番のグルタミン酸コドンのアラニンのコドンに置換したDNAをもつエフェクタープラスミドpM3-191/225ERF3を構築した。

【0031】これらのプラスミドをそれぞれレポーター遺伝子pGAL4-LUCとともにプロトプラストに導入し、レポーターの活性を測定し、置換されたアミノ酸がリプレッサー機能に影響を及ぼすかについて調べた。その結果、197番目のアスパラギン酸をアラニン置換したpM1-191/225ERF3および224番目のグルタミン酸をアラニンに置換したpM3-191/225ERF3エフェクタープラスミドは、リポーター遺伝子の活性を抑制する効果が、置換をおこなっていないpGALDB-191/225ERF3と同様にあることから、これらのアミノ酸部位はリプレッション機能に関与しないと考えられる。一方、214と216番目のアスパラギン

ン酸をアラニンに置換したエフェクタープラスミド pM2-191/225ERF3は、リポーター遺伝子の活性を抑制する効果を失った（図5）。このことから、214と216番目のアスパラギン酸を含む領域がリプレッサー機能に重要な領域であることが明らかになった。この配列を持つペプチドがリプレッサーとしての機能に関わる新規な配列であることを実証した。

【0032】本発明の遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチドは、例えばガン遺伝子の転写調節領域に特異的に結合するDNA結合タンパク質と融合させて、細胞内で発現させることにより、ガン遺伝子の発現を効率的に抑制することが可能となる。また、リプレッサー機

能は調べたところ遺伝子に非特異的であるが、DNAとの結合が必要であることから、特定のDNAに結合するDNA結合ドメインと融合することにより、遺伝子特異的あるいは非特異的に転写を抑制することが可能となる。このことによって、例えば色素代謝系の酵素をコードする遺伝子の発現を制御することが可能となり、これまでには得られなかった色違いの花弁を有する花を創作することができる。また、アレルゲンとなるタンパク質の発現を抑制することによって、アレルゲンの少ない食物の生産も可能となる。

【0033】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<:110>:Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<:120>:Novel repression domain of plant specific transcription factor

<:130>:

<:160>: 24

<:210>: 1

<:211>: 678

<:212>: DNA

<:213>: Nicotiana tobacum

<:400>:1

atg gct gtc aaa aat aag gtt agt aat ggc aat ctg aaa gga gga aat	48
Met Ala Val Lys Asn Lys Val Ser Asn Gly Asn Leu Lys Gly Gly Asn	
5 10 15	

gtg aaa aca gat gga gtt aag gag gtt cac tac aga ggt gta agg aag	96
Val Lys Thr Asp Gly Val Lys Glu Val His Tyr Ser Gly Val Ser Lys	
20 25 30	

agg cca tgg ggt cgg tat gca gct gaa atc cgt gac ccg ggt aag aag	144
Ser Pro Trp Gly Arg Tyr Ala Ala Glu Ile Arg Asp Pro Gly Lys Lys	
35 40 45	

agt cgg gtc tgg tta ggt act ttc gac acg gcg gaa gag gcg gct aag	192
Ser Arg Val Trp Leu Gly Thr Phe Asp Thr Ala Glu Glu Ala Ala Lys	
50 55 60	

gcg tac gac acc gcc gct cga gag ttt cgt gga ccc aaa gca aaa act	240
Ala Tyr Asp Thr Ala Ala Arg Glu Phe Arg Gly Pro Lys Ala Lys Thr	
65 70 75 80	

aac ttc cct tca ccg acg gag aat cag agc cca agt cac agc agc acc	288
Asn Phe Pro Ser Pro Thr Glu Asn Gln Ser Pro Ser His Ser Ser Thr	
85 90 95	

gtg gag tcc tct agt gga gag aat ggt gtt cac gcg ccg cct cat gcg 336
 Val Glu Ser Ser Ser Gly Glu Asn Gly Val His Ala Pro Pro His Ala
 100 105 110

ccg ctc gag ctg gat ctc acg cgc cgt ctt ggc tcc gtt gct gca gat 384
 Pro Leu Glu Leu Asp Leu Thr Arg Arg Leu Gly Ser Val Ala Ala Asp
 115 120 125

ggc ggt gac aac tgt cgc cgt tct ggg gaa gtt ggg tac ccg att ttc 432
 Gly Gly Asp Asn Cys Arg Arg Ser Gly Glu Val Gly Tyr Pro Ile Phe
 130 135 140

cac cag cag ccg act gtg gcg gtt ctg cca aat ggc cag ccg gtt ctg 480
 His Gln Gln Pro Thr Val Ala Val Leu Pro Asn Gly Gln Pro Val Leu
 145 150 155 160

ctc ttt gat tct ttg tgg cgg gcg gga gtt gtt aac agg cct cag cct 528
 Leu Phe Asp Ser Leu Trp Arg Ala Gly Val Val Asn Ser Pro Gln Pro
 165 170 175

tac cat gta acg ccg atg ggg ttt aac ggc gtt aac gcc gga gtg ggt 576
 Tyr His Val Thr Pro Met Gly Phe Asn Gly Val Asn Ala Gly Val Gly
 180 185 190

cct act gtg tcg gac tcg tcc tct gca gtg gaa gag aac caa tat gat 624
 Pro Thr Val Ser Asp Ser Ser Ser Ala Val Glu Glu Asn Gln Tyr Asp
 195 200 205

ggg aaa aga gga att gat ctt gat ctt aac ctt gct cca cct atg gaa 672
 Gly Lys Ser Gly Ile Asp Leu Asp Leu Asn Leu Ala Pro Pro Met Glu
 210 215 220

ttt tga 678
 Phe
 225

<:210>: 2
 <:211>: 22
 <:212>: RPT
 <:213>: Nicotiana tobacum

<:400>:2
 Glu Asn Gln Tyr Asp Gly Lys Ser Gly Ile Asp Leu Asp Leu Asn Leu
 5 10 15
 Ala Pro Pro Met Glu Phe
 20

<:210>: 3
 <:211>: 53

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<:400>: 3

agatctcata agagccgcc ctaaaataag accgatcaaa tagagccgcc atg

<:210>: 4

<:211>: 19

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 4

gatggctgtc aaaaataagg

<:210>: 5

<:211>: 37

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 5

ccaaataaca ttatcggtcg actcaaattcc ataggtg

<:210>: 6

<:211>: 20

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 6

gatggctgtc aaaaataagg

<:210>: 7

<:211>: 28

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 7

cttccttaca ccgtcgactt aaacctcc

<:210>: 8

<:211>: 25

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 8

tcactacaga ggtgtaagga agagg

<:210>: 9

<:211>: 31

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 9

ctctgattct cgtcgactta agggaagtta g

<:210>: 10

<:211>: 21

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 10

ttcaccgacg gagaatcaga g

<:210>: 11

<:211>: 21

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 11

ttcaccgacg gagaatcaga g

<:210>: 12

<:211>: 32

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 12

gccatctgca gcgtcgactc aaagacggcg cg

<:210>: 13

<:211>: 24

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 13

ctccgttgct gcagatggcc ggtg

<:210>: 14

<:211>: 32

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 14

tccgacacag tagggtcgac tcaggcgta ac

<:210>: 15

<:211>: 24

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 15

agtgggtcct actgtgtcgg actc

<:210>: 16

<:211>: 19

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 16

agagaaccaa tatgatggg

<:210>: 17

<:211>: 65

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<:400>: 17

agcttagatc tgcaagaccc ttcctctata taaggaagtt catttcattt ggagaggaca

10 20 30 40 50 60

cgctg

65

<:210>: 18
<:211>: 65
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<:400>: 18
gatccagcgt gtcctctcca aatgaaatga acttccttat atagaggaag ggtcttgag
 10 20 30 40 50 60
atcta
 65

<:210>: 19
<:211>: 19
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 19
ccgacacagt aggacccac

<:210>: 20
<:211>: 21
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 20
gtcgtcctc tgcagtggaa g

<:210>: 21
<:211>: 20
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 21
caattcctct ttcccatca

<:210>: 22
<:211>: 20
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 22
ctcttgctct taaccttgct

<:210>: 23
<:211>: 20
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 23
ccataggtgg agcaaggta

<:210>: 24
<:211>: 19
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 24
cattttgatg atgacgtaa

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpBI221からpGAL4DB-ERF3を構築する手順を示す図である。

【図2】レポーター遺伝子GAL4-LUCを構築する手順の前半部を示す図である。

【図3】図2に引き続きレポーター遺伝子GAL4-LUCを構築する手順の後半部を示す図である。

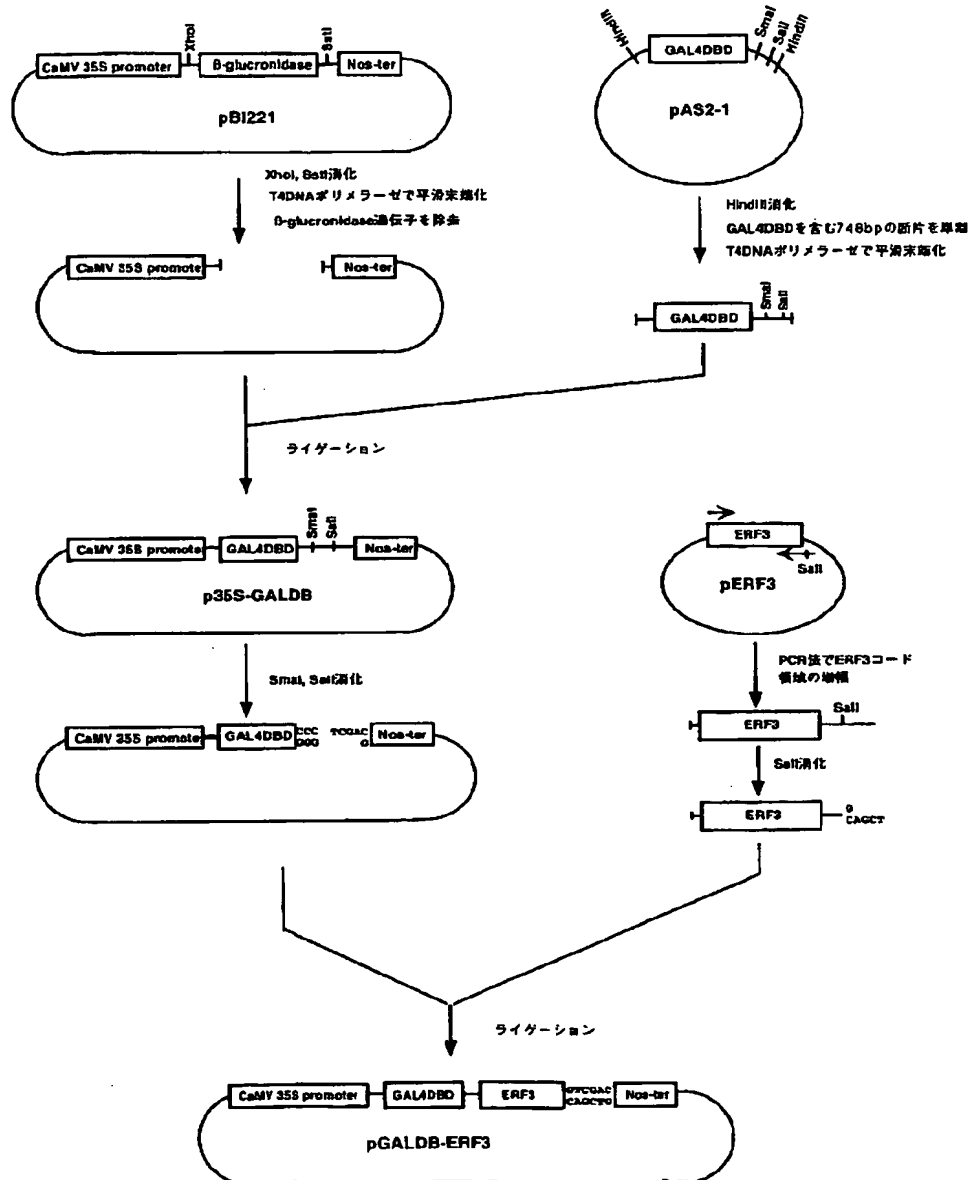
【図4】Aはリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドを示す図である。図において、5XGAL4: GAL4転写因子DNA結合配列、TATA: CaMV35SプロモーターTATAボックスを含む領域、LUC: ルシフェラーゼ遺伝子、CaMV 35S: カリフラワーモザイクウイルス35Sタンパク質遺伝子プロモーター、GAL4 DB: 酵母GAL4転写因子DNA結合ドメインコード領域、Nos: ノパリン合成酵素遺伝子転写終止領域を表す。BはERF3およびERF3のディリーションがリポーター遺伝子の活性(Relative Activity)に及ぼす影響を示す図である。図において、左の各数字(1/225等)

は、ERF3のアミノ酸領域を示す。真ん中のボックスは左の数字に該当するアミノ酸配列領域を示す。右のグラフは、左の領域をもつエフェクタープラスミドを導入したときのリポーター遺伝子の活性を示す。エフェクターを入れないときのリポーター遺伝子の活性を100とした。ERF3およびERF3ディリーションのエフェクターの内、アミノ酸配列1/225, 83/225, 191/225, 201/225を持つエフェクターがリポーター遺伝子の活性を50%に減少させ、転写を抑制する効果を持つことが示されている。抑制効果(リプレッサー機能)の最小の領域は、201/225にあることからこの領域がリプレッサードメインであることを明らかにした。

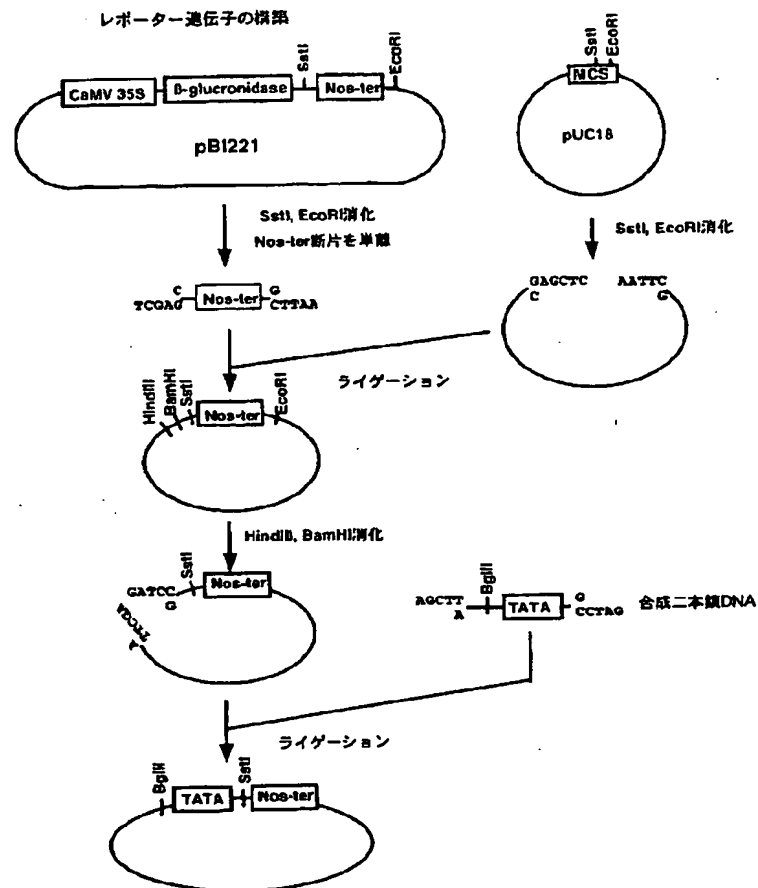
【図5】リプレッサードメインのアミノ酸置換実験の結果を示す図である。タバコERF3のリプレッサードメインとして機能する191/225の領域内の214と216のアスパラギン酸をアラニン(A)に置換したものだけがリプレッサー機能を喪失することからこの領域がリプレッサー機能に重要なアミノ酸配列であることを示している。

【図1】

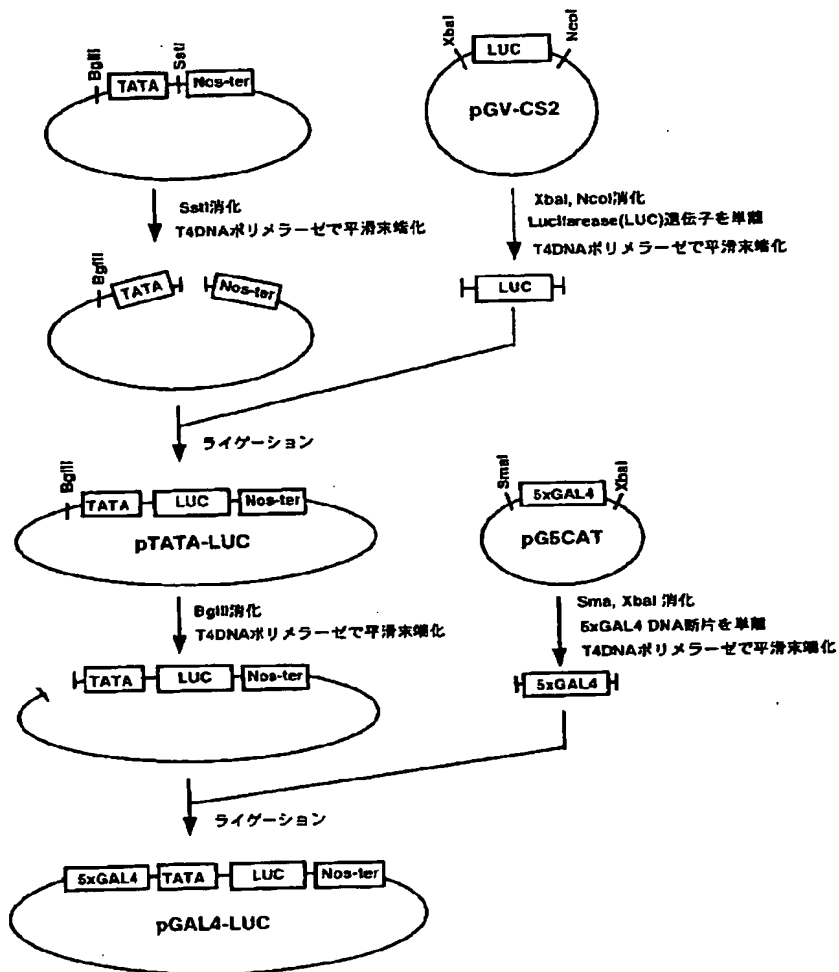
エフェクタープラスミドの構築



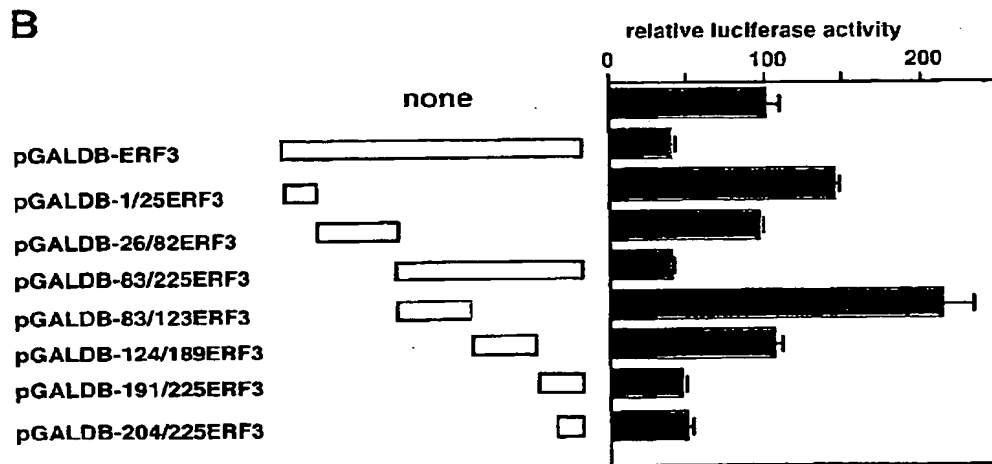
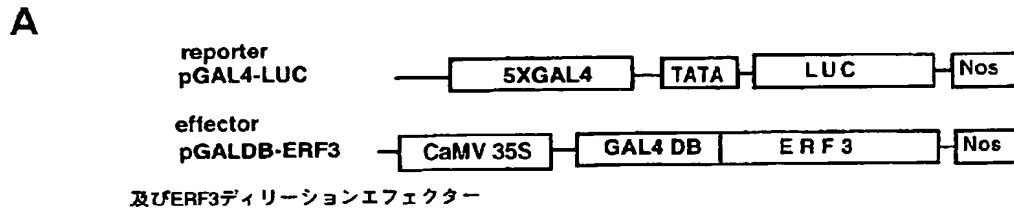
【図2】



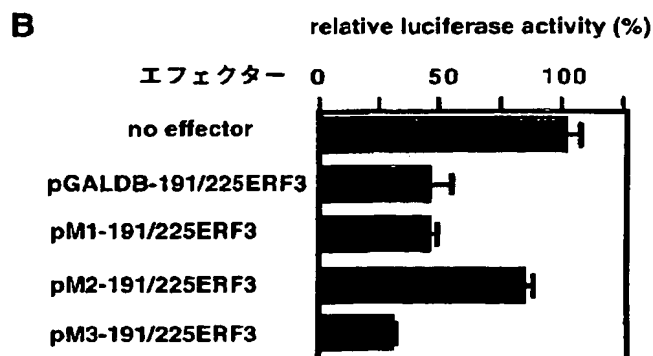
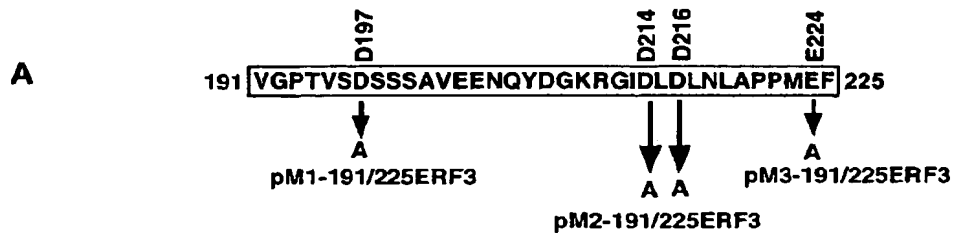
【図3】



【図4】



【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成12年4月11日(2000. 4. 11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正内容】

【0019】レポーター遺伝子の構築(図2及び図3参照)

プラスミドpUC18を制限酵素EcoRIとSstIで消化する。pBI221(クローンテック社)を制限酵素EcoRIとSstIで消化し、Nos-ter(nopaline synthase terminator)領域を含む270bpのDNA断片を挿入するアガロースゲル電気泳動によって単離する。得られた断片を制限酵素EcoRIとSstIで消化しておいたプラスミドpUC18のEcoRI-SstI部位に挿入する。カリフラワーモザイクウイルス35SプロモーターTATAボックスを含む相補鎖のDNA1(配列番号17)AGCTTAGACTGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGACAGCTG及びDNA2(配列番号18)GATCCAGCGTGCTCCTCCAAATGAAATGAACCTTCCTATATAGAGGAAGGCTCTGCAGATCTAを合成する。合成したDNAを90℃2分加熱した後、60℃で1時間加熱し、その後室温(25℃)で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させる。Nos-terを持つpUC18プラスミドを制限酵素HindIIIとBamHIで消化する。合成した2本鎖DNAをpUC18のHindIII-BamHI部位に挿入し、TATA-boxとNos-terを含むプラスミドを構築する。上記した手順は、図2に示した。

た。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】(エレクトロポレーションによる遺伝子導入)上記で得たプロトプラストを濃度が 2.5×10^6 細胞/mLになるようにエレクトロポレーション緩衝液(5 mM MES pH5.8, 70 mM KCl, 0.3 M マニトール)に再懸濁する。エレクトロポレーション用キュベット(ジーンパルサーキュベット 0.4 cm electrode, バイオラッド社製)に構築したpGAL4-LUCレポーター遺伝子とエフェクタープラスミドとしてpGALDB-ERF3あるいはそのデレションシリーズ(pGALDB-1/25ERF3~pGALDB-204-225ERF3)のDNAを各10 μ gとリファレンス遺伝子プラスミド1 μ gを100 μ Lの2Xエレクトロポレーション緩衝液(10mM MES pH5.8, 140 mM KCl, 0.6 M マニトール)を加えて、滅菌水で全量を200 μ Lにする。キュベットに600 μ Lのプロトプラスト懸濁液を入れて、エレクトロポレーター(Genepulser II Electroporation System バイオラッド社製)を用いて600 V, 25 mFの条件でDNAを導入する。導入後、キュベットからプロトプラストを1,000 rpmで5分間遠心して回収し、5 mLの0.4 M マニトールを含むMS培地にプロトプラストを再懸濁して、26℃で6時間暗所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	ターマコード(参考)
C 1 2 N 5/10		C 1 2 R 1:91)	
// C 1 2 P 21/02)	
(C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:91)		5/00	C
(C 1 2 N 5/10		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)			

Fターム(参考) 4B024 AA08 AA11 AA20 BA80 CA04
DA01 EA04 GA14 GA17 GA21
HA13
4B064 AG01 CA11 CA19 CC01 CC24
DA11
4B065 AA89X AA89Y AB01 AC14
AC16 AC20 BA03 BA10 BA16
BB01 BC01 BC03 BD50 CA24
CA46 CA53
4H045 AA10 AA20 BA10 CA30 EA05
EA50 FA74

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.